第32卷 第3期 昆虫学报 Vol. 32, No. 3
1989年8月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Aug., 1989

不同培养基对格氏线虫产量和毒力的影响

徐浩莲 杨平 刘秀玲
(广东省昆虫研究所,广州)

摘要 本文比较了五种人工培养基对昆虫病原格氏线虫 *Steinernema glaseri* 生长、繁殖、产量、带菌率和毒力的影响。经筛选以D培养基(鸡杂71%、猪油16%、海绵碎8%、水5%)最好,每瓶70克产量达10—26×10⁶条。其培养的格氏线虫子代带菌率最高,毒力最强。以培养基、接菌量和接线虫量这三个影响线虫产量的主要因素的正交试验表明:本组合中,接菌量的多少是影响线虫产量的主导因素。

关键词 格氏线虫 培养基

格氏线虫 *Steinernema glaseri* 自本世纪30年代大田防治日本金龟子幼虫成功以来,已被认为是一种很有潜能的防治食根甲虫的生物防治因子。据知对白缘象甲、草蛴螬、突背蔗龟等农、林、牧害虫均有不同程度的防效。但多年来,由于对共生菌 *Xenorhabdus nematophilus* 在线虫繁殖和毒力的作用认识不足,以致病原线虫的繁殖和应用停滞不前。自 Bedding (1981、1984) 采用接入线虫共生菌于脂肪、猪肾、鸡杂、海绵等人工培养基大量繁殖线虫成功以来,才使大面积应用病原线虫防虫成为可能。

我国自50年代以来,先后从国外引进了昆虫病原线虫作防治害虫的尝试,线虫的保种和繁殖均以动物肝、高压消毒大蜡螟或活大蜡螟作宿主,产量低且线虫易退化,远不适应大面积应用的需要。尤其是格氏线虫,其携带的共生菌 *X. nematophilus poinarii* 的致病性较低,而不带菌的格氏线虫的致病性更低 (Akhurst, 1985) 在害虫防治上无应用价值。为此,我们开展了对影响格氏线虫产量和毒力的一系列因素的研究。

本文报道的是近年来我们采用加入初生型共生菌后再接入线虫的方法 (Bedding, 1981、1984),比较了本地材料组合的几种培养基对格氏线虫生长和繁殖的影响;对格氏线虫带菌率和毒力的影响以及培养基、接线虫量和接菌量三者之间对线虫产量的影响。试图寻找生产格氏线虫合适的配方和组合,繁殖出高产、优质的病原线虫,以利于大田应用并取得成功。

材料和方法

格氏线虫 *S. glaseri* NC 513. NC 34 由澳大利亚 Bedding 博士提供,各种培养基按配方的比例(表1)混合,鸡杂放入高速捣碎机捣成匀浆后与海绵碎混合,按每瓶70克装入500毫升三角瓶封好,经1.5公斤高压灭菌30—40分钟,接入线虫种前每瓶加入8毫升细菌肉汤悬液,混合均匀后放在25±1℃下培养,4天后再接入线虫种,在同样温度

文本于1987年2月收到。

下培养 15—20 天收获线虫，每瓶抽样 1 毫升培养基浸出的线虫液（三个重复）以计数板计算线虫的产量。

表 1 五种培养基的配方

配方 \ 比例 \ 材料	蛋白胨	牛肉膏	酵母膏	碳酸钙	葡萄糖	面粉	鸡蛋	鸡杂	鱼肠	猪油	海绵	水
A	0.92	0.92	—	—	—	22.9	22.9	—	—	4.59	8.39	39.4
B	—	—	1.83	1.83	0.92	22.9	22.9	—	—	1.83	8.39	39.4
C	—	—	—	—	—	—	—	80	—	—	10	10
D	—	—	—	—	—	—	—	71	—	16	8	5
E	—	—	—	—	—	—	—	—	80	—	10	10

格氏线虫繁殖率的计算参照 Chang 和 Negherbon（1947）微生物对数增长率公式

$$T = \frac{t\log 2}{\log b - \log a} = \frac{\log 2}{0.434k} = \frac{0.301}{K}$$

a：线虫开始时的数量，b：培养一定时间"t"后线虫的数量，K：天然对数的增长常数，k：同样对数在以 10 为底的增长常数，T：有机体每代增殖所需要的时间。

接种的共生菌自格氏感染期线虫分离，经营养琼脂和麦康凯培养基检查鉴定为初生型共生菌后，接入牛肉汤孵育 16—24 小时，使用时抽样在血球计数器计数，以估计接入的菌量。

培养基、接入线虫量、接入共生菌量的不同组合对格氏线虫产量的影响用正交试验 $L_{18}(6\times 3^6)$ 方案考查。三个因素中，培养基为五种组合（A、B、C、D、E），每瓶接线虫量为三个水平（1.2×10^5，0.59×10^5，0.12×10^5），接入的共生菌量为三个水平（8.7×10^8，1.4×10^8，0.3×10^8）共 18 个处理，试验重复二次，结果进行方差分析。

线虫带菌率的观察：每样品随机抽取 25 条感染期线虫，切断其食道球前部，使食道

表 2 在 500 毫升三角瓶中 70 克培养基培养的格氏线虫的产量*（25±1℃）

培养基 \ 产量(条/瓶) \ 处理	1		2	
	接菌量 1.63×10^9 接线虫量 1.16×10^6	增殖倍数	接菌量 1.94×10^7 接线虫量 1.68×10^5	增殖倍数
A X±S. E.	$7.90\times 10^6 \pm 3.89\times 10^6$	6.81	$10.09\times 10^6 \pm 1.1\times 10^6$	60.1
B X±S. E.	$9.93\times 10^6 \pm 3.00\times 10^6$	8.56	$7.80\times 10^6 \pm 0.61\times 10^6$	46.4
C X±S. E.	$9.03\times 10^6 \pm 3.95\times 10^6$	7.78	$5.70\times 10^6 \pm 0.51\times 10^6$	33.9
D X±S. E.	$26.7\times 10^6 \pm 2.89\times 10^6$	23.02	$10.16\times 10^6 \pm 2.20\times 10^6$	60.5
E X±S. E.	$6.90\times 10^6 \pm 1.48\times 10^6$	5.95	—	—

* 各处理每配方设五个重复。

球连同前肠从头部吐出，干后以复红染色，用 × 100 油镜检查细菌囊及细菌数，计算带菌的线虫的百分率。

线虫的毒力测定：用人工饲料饲养的 4—5 龄大蜡螟幼虫 20 条，放在 9 厘米垫有两层滤纸的双重皿上，每虫以 20 条感染期线虫量感染，放在 25±1℃ 下，每 12 小时观察其死亡数一次，连续 96 小时。测定设三个重复，结果进行统计分析。

结　　果

一、几种培养基对格氏线虫繁殖率和产量的影响

五种培养基均可使格氏线虫数倍的增殖，但由于接菌量和接线虫量的不一，每次增殖的倍数不一。实验证明(表 2，表 3)，格氏线虫在 D 培养基发育历期最短，约 3—4 天便可增殖一代，线虫的增殖高峰在接种线虫后的第 8—14 天，线虫在此期间繁殖 2—3 代，随着瓶内氧气和营养被消耗，代谢产物所产生的毒素出现，格氏线虫接种 15 天后不收获便在瓶内逐渐死亡，而其它线虫种收获期稍长。

在 D 培养基，格氏线虫的产量可达 10—26 × 10^6/瓶，子代线虫整齐、活跃、死亡率低。

表 3　格氏线虫在各种不同培养基下 20 天的繁殖率

培养基	第一批		第二批	
	K	T	K	T
A	0.04165	7.2268	0.08894	3.3843
B	0.04660	6.4592	0.08335	3.6112
C	0.04458	6.7519	0.07654	3.9325
D	0.06810	4.4199	0.08909	3.3786
E	0.03870	7.7777	—	—

二、培养基、接入线虫量、接入共生菌量三者对格氏线虫产量的影响

数据统计分析如表 4，由表可见，本试验中影响线虫产量的主要因子是接入共生菌的数量，其次是培养基的组成。接菌量的多少对格氏线虫产量的影响是显著的，就所选择的五种培养基、三个水平的接线虫量和三个水平的接菌量而言，最佳的组合应为：使用 D 培养基，接入 8.7 × 10^8 个细菌，接入 1.2 × 10^5 条线虫的产量最高。

表 4　影响格氏线虫产量的各因子的方差分析

变异原因	平方和×10^7	自由度	均方×10^7	F	$F_{0.05}$
培养基配方 (a)	$S_a = 3.15$	4	0.788	2.39	3.36
接种线虫量 (b)	$S_b = 0.45$	2	0.225	<1	
接种菌量 (c)	$S_c = 4.86$	2	2.415	7.32	4.26
误差	$S_e = 2.97$	9	0.33		
总和	$S = 11.39$	17			

三、不同培养基培养的格氏线虫的带菌率和毒力

从抽样检查表明：用不同的培养基培养的线虫子代的带菌率不一致，以 D、C 培养基

培养的线虫带菌率最高（76%），其次是A培养基（56%），B培养基带菌率最低。如图1所示，用不同培养基培养的线虫子代的毒力不一，D培养基培养的线虫毒力最强，对大蜡螟幼虫的致死中时为49小时，而B培养基培养的格氏线虫对大蜡螟幼虫的致死中时达78小时。

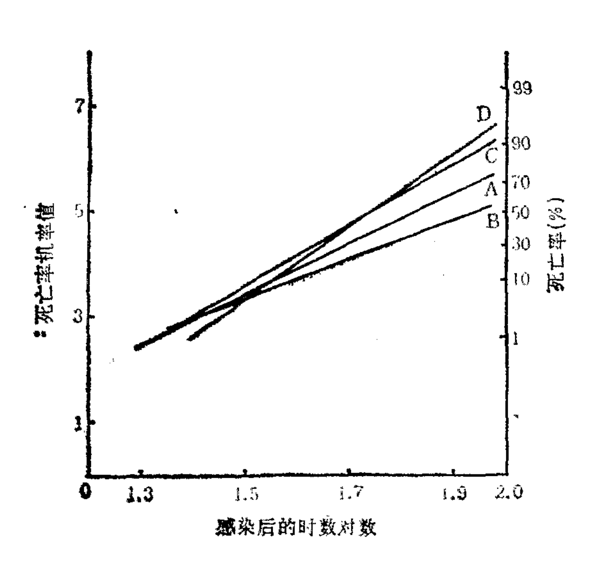


图1 不同培养基培养的格氏线虫对大蜡螟幼虫的时间—死亡率反应

总结与讨论

格氏线虫所携带的共生菌 *X. nematophilus poinarii* 能把培养基转化为线虫所能利用的营养，它能在多种氮源、碳源和无机盐中生长，繁殖。因而我们组合的五种人工培养基均能使格氏线虫发育和繁殖。但在不同的培养基里，线虫的发育速度，繁殖量和繁殖代数有明显的差异。本实验中以D培养基最佳，每70克培养基产量可达 $10—26 \times 10^6$ 条线虫，高于国外报道（Bedding，1981）的用脂肪、猪肾匀浆海绵生产格氏线虫 $6.5—10 \times 10^6$ 条的产量，实验中的D配方由 Bedding （1984）配方的基础上加以改进而成，它较 Bedding 配方增加了脂肪的含量，并采用猪油作为脂肪的来源，使格氏线虫的产量增加了1—3倍且产量一直较稳定。

为探求产量与营养的关系，我们曾对五种配方及大蜡螟幼虫的氨基酸含量进行分析，发现对格氏线虫生长、发育消耗大的亮氨酸、赖氨酸等八种氨基酸中，D配方的含量最接近大蜡螟幼虫的含量（分别为5.4784%、5.4034%）。又经测定，每头大蜡螟幼虫（$\bar{x} \approx$ 0.277克）繁殖的线虫量为 5.3×10^4 条，而用D配方等量的培养基接入共生菌培养格氏线虫的产量可达 $3.9—10.2 \times 10^4$ 条，其余4个配方均达不到大蜡螟产量的水平。所以，在D配方中增大了猪油的含量，可能有助于抑制其它杂菌的生长，而提高胆固醇的比例更有利于格氏线虫的生长和繁殖。

在D培养基培养的格氏线虫带菌率高，说明营养条件对线虫携带共生菌的能力有很大的影响。由于线虫的带菌率与线虫的毒力成正相关（Dunphy，1985），因此，在生产线虫中必需选择合适的培养基以提高线虫的产量和维持格氏线虫有较高的带菌率，才能使格氏线虫在防治虫害中发挥应有的作用。

参 考 文 献

Akhurst, R. J. 1980 Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* **121**: 303—9.

Akhurst, R. J. 1985 The nematode bacterium complex *Steinernema glaseri/Xenorhabdus Nematophilus* Subsp. *Poinarii*, pathogenic for rootfeeding scarab larvae proc. *4th Australian Conf. On Grassl. Invert. Ecol. Linco College, Canterbury* 13—17 May.

Bedding, R. A. 1981 Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* Species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematological* 27: 109—14.

Bedding, R. A. 1984 Large scale production storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis spp. Ann. appl. Biol.* 104: 117—20.

Dunphy, G. Betal, 1985 Growth and virulence of *Steinernema glasseri* influenced by different subspecies of *Xenorhabdus nematophilus. J. Nematology* 17(4): 476—82.

EFFECT ON THE PRODUCTIVITY AND VIRULENCE OF THE INSECTICIDAL NEMATODE *STEINERNEMA GLASERI* IN DIFFERENT CULTURE MEDIA

Xu Jie-lian　Yang Ping　Lu Xiu-ling

(*Guangdong Institute of Entomology, Guangzhou*)

Five media were selected for a comparative study on the growth rate, productivity, symbiotic bacteria and virulence of the insecticidal nematode *Steinernema glaseri*, which is a potential biological agent for insect control. The results showed that the medium D composed of chicken offal 71%, sponge 8%, lard 16% and water 5% was the best for the preformance of the nematode. It yielded 10—26$\times 10^6$ infective nematodes per 70 grams and the nematodes thus produced had higher virulence and retained more symbiotic bacteria than those from other media. The perpendicularity test showed that the number of the bacterial inocula played a leading role in mass production of the nematode.

Key words *Steinernema glaseri*——culture medium